

## 耐熱性リパーゼリアクターによる油脂の合成と分解に関する研究

著者	小杉 佳次
号	453
発行年	1992
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16656">http://hdl.handle.net/10097/16656</a>

氏 名(本籍) 小<sup>こ</sup> 杉<sup>すぎ</sup> 佳<sup>よし</sup> 次<sup>つぐ</sup>

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 4 5 3 号

学位授与年月日 平 成 4 年 5 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 耐熱性リパーゼリアクターによる油脂の  
合成と分解に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 一 島 英 治  
教 授 伊 崎 和 夫  
教 授 折 谷 隆 之

# 論文内容要旨

## 序 論

リパーゼ(EC 3.1.1.3)反応の特徴は、油と水のような常温で二相をなす不均一な系で作用することである。リパーゼ活性は基質の存在状態によって異なる。リパーゼ蛋白は疎水界面に親和性を有し、ブタすい臓リパーゼのように界面認識機能をもつものも知られている<sup>1)</sup>。本研究はリパーゼ反応の解析を行い、不均一系の酵素反応を解明する一端を担おうとするものである。

リパーゼの反応は、油脂分解のみならずエステル合成、エステル交換及びラセミ体の光学分割に利用されている<sup>2)</sup>。リパーゼを用いるリアクターは不均一系酵素反応の好適の研究材料である。本研究は、中度高温領域における耐熱性リパーゼを、油化学工業の基幹プロセスであるトリアシルグリセロール分解及び合成に応用するための基礎的な研究を取りまとめたものである。

## 第1章 耐熱性リパーゼの探索

(1-1) 60℃付近の中度高温領域に最適反応性をもつ耐熱性リパーゼが製造されれば、工業的油脂分解原料として広く使用されている牛脂等の融点の高い油脂の分解に応用される。Fig. 1 に示すように、60-70℃で油脂を効率よく分解する高温反応性の耐熱性リパーゼを生産する *Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica* を分離した。このリパーゼによる油脂分解率を向上させるためには塩化カルシウムの添加が必要であった<sup>1)</sup>。

(1-2) 油脂分解反応液に塩化カルシウムを添加すると、脂肪酸の回収を困難にする。牛脂を単一炭素源として分離した微生物の培養液9ml、および牛脂1.5gのほかは塩化カルシウムのような補助因子を用いない反応液による、反応経過曲線を比較して *Pseudomonas fluorescens* biotype I を選択した。本菌のリパーゼを用いると油脂分解率は、70℃においても90%以上を示した。Table 1 に示すごとく分解産物の分析からも、本リパーゼはグリセリドの位置に対する特異性を持た

---

<sup>1)</sup> P. Desnuelle, "The Enzyme," Vol. 7, Third edition, ed. by P. D. Boyer, Academic Press, New York and London, 1972, pp. 575-616.

ないリパーゼであることが明らかであった。<sup>2)</sup>。

(1-3) 高温反応性でかつ油脂分解性の優れたリパーゼ生産菌株として *Pseudomonas cepacia* も選択した。本菌のリパーゼは 最大活性値が高く、Fig. 2に示すように *P. fluorescens* biotype I よりも、分解反応の立ち上がりが早い反応経過曲線を示した<sup>2)</sup>。 *P. cepacia* のリパーゼは油脂分解能から見ると優れたものであるが、 *P. cepacia* 株のあるものは日和見感染性があるので、本菌株がもし日和見感染性があった場合を想定し、バイオハザード対策を検討した。本菌株を閉鎖系で培養し閉鎖系を解除することなく、60℃、30分間維持すると、培養液中の生菌数はなくなるので、微生物の遺漏や環境汚染の心配はなくなることが明らかになった。しかもこの処理によってリパーゼは失活することなく、むしろ活性化された<sup>3)</sup>。

かくして、バイオハザード対策を含め、耐熱性リパーゼの製造法を確立した。

## 第2章 リパーゼ活性の評価法

### (2-1) 初速度評価法

リパーゼ活性は乳化基質を使う方法と、オリーブ油や牛脂を反応液とともに振とうする非乳化基質を使う方法で測定する必要があった。Table 2の活性収率は、固定化するために用いたリパーゼ活性量に対する固定化リパーゼの活性を表している。同量のリパーゼを Dowex MWA-1 に固定化したものであるにもかかわらず、活性収率が異なっている。オリーブ油やトリブチリンは反応液に溶けず乳化基質となる。乳化基質を用いると活性収率は1%以下と著しく低い。可溶性生産物であるグリセリンで測定してもこの低さは解消しない。しかしトリブチリンと同じモル数のトリアセチンを用いると活性収率が著しく向上した。トリアセチンは非乳化基質である。非乳化基質は連続相をなすため基質の内部拡散が改善されるためと考えられた<sup>3, 4)</sup>。

### (2-2) 反応経過曲線近似法

同じ基質特異性をもつリパーゼを同活性量用いてもFig. 2に示すごとく反応経過曲線はリパーゼの起源により違っている。これらの現象を解析するために反応経過の新しい近似法を確立した。t時間後のリパーゼによる油脂の分解率を100%

とすると

$$r = tR/(t_m + t) \quad (1)$$

なる関係があることを見いだした。 $R$ は最終分解率、 $t_m$ は分解率が $R/2$ になるまでの反応時間である。 $r$ および $t$ の両逆数プロットをとると直線になり容易に $R$ および $t_m$ を求める事ができる。 $R/2$ になるまでの反応経過曲線がMichaelis-Menten式に従うとすると、反応の立ち上がり易さを示す新しいパラメーターである $t_m$ は

$$t_m = \{-\ln [1-(R/2)]\} K_m/V_{max} + s_0 R/2V_{max} \quad (2)$$

となる。ここで $K_m$ はミカエリス定数、 $V_{max}$ は最大反応速度、 $s_0$ は初期基質濃度である。 $R$ は酵素の失活定数、初期酵素濃度、平衡定数あるいは $s_0$ などの関数であった<sup>4, 5)</sup>。

### 第3章 リパーゼの固定化法

連続油脂分解を行うためには固定化したリパーゼによって酵素を反復使用しなければならない。本研究はバイオニクス研究の一環として天然の固定化リパーゼである菌体結合リパーゼの解析から研究を開始した。

#### (3-1) 菌体固定化法

*P. mephitica* var. *lipolytica*の生産するリパーゼは硫安を含む培地で培養すると、95%が菌体結合リパーゼとして生産された。菌体結合リパーゼ生産菌体をpH 5で70℃に30分間維持し菌体にリパーゼを固定化した。この菌体固定化リパーゼによりトリアセチン、トリブチリンの連続分解を行った。菌体固定化リパーゼと遊離のリパーゼの最適反応温度はほぼ等しかったが、反応の活性化エネルギーに著しい相違がみられた<sup>5)</sup>。菌体結合リパーゼを抽出した活性量に対する菌体固定化リパーゼの活性収率を乳化基質を用いて測定すると Table 3に示すように80-90%であった。乳化基質の粒径が0.95ミクロン付近であったので、*P. mephitica* var. *lipolytica*のリパーゼは、細胞表層に結合していることが推定された<sup>5)</sup>。

#### (3-2) リパーゼの疎水基に対する吸着機構

上記菌体固定化リパーゼによる長鎖のトリアシルグリセロールの連続分解は困難であった。臭化シアンで活性化したアガロースに疎水基を結合させて、リパーゼの吸着溶出関係について研究した。リパーゼは直鎖状の脂肪族、またはベンゼ

ン等の疎水基に対しては、吸着量も多く、pHや塩濃度の変化では溶出せず、界面活性剤あるいは水と混和する有機溶媒で始めて溶出した。シクロペンタン、シクロヘキサン等の疎水基に対しては、吸着量は前者と変わらないが、イオン強度やpHを変化させると溶出した。一方分枝状脂肪族や複素環族の疎水基に対しては吸着量も少なく、これらの疎水基は吸着に対して立体障害を起こすものと考えられた<sup>8,9)</sup>。Fig. 3に *P. mephitica* var. *lipolytica* のリパーゼのアフィニティクロマトグラフィーを示す<sup>7)</sup>。当時はトリアシルグリセロールのエマルジョン粒子に吸着したリパーゼをトリトン X-100で溶出するような精製法が報告されていたが<sup>2)</sup>、本研究により 初めてアフィニティクロマトグラフィーをリパーゼに適用することに成功した。

### (3-3) 生産物阻害を受けない固定化法

高濃度の牛脂を反応させて最終分解率が高く、しかも反応後、生産物との分離も容易な固定化法を検索し、*P. fluorescens* biotype I のリパーゼをマクロ細孔を有する弱塩基性陰イオン交換樹脂Dowex MWA-1 に吸着させ、グルタルアルデヒドで強化する方法を選択した<sup>8)</sup>。この固定化リパーゼによると、基質濃度が90%以上であっても Table 4に示すように、最終分解率は70-90%と高い値を示した。一方固定化するために用いた可溶性リパーゼは、固定化の際の活性損失や立体障害がないにもかかわらず、基質濃度90%以上では最終分解率は40-60%と低かった。*P. fluorescens* biotype I のリパーゼを固定化すると 陰イオン交換基の静電的な反発により、油脂分解生産物である脂肪酸が高濃度存在する pH4付近の反応液中においても、本リパーゼの結合している微細環境のpHは、最適pHの6付近に保たれるためと考えられた<sup>8,10)</sup>。

## 第4章 不均一系バイオプロセスのインテグレーション

バイオプロセスによる物質生産は多段階の反応から構成されているため多段階のプロセスを必要とする。そのため全体の収率が低下する。多段階のバイオプロ

---

<sup>2)</sup> J. H. Ledford and P. Alaupovic, *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 132-148 (1975).

セスを一体化し、収率を向上させるとともに新たな機能を付加したプロセスを構築する必要がある。<sup>33)</sup> 不均一系バイオプロセスは基質及び生産物が分離しやすいため、生産物の分離機能を備えた連続反応装置を構築しやすい。

#### (4-1) 向流式固定床型油脂分解リアクター

非乳化基質を用いるリアクターとして、前章のごとく Dowex MWA-1 に固定化した *P. fluorescens* biotype I のリパーゼを、Fig. 4 のような向流式固定床型リアクターを用いて、連続油脂分解と同時に油状産物と水溶性産物の連続分別採取を行った<sup>33)</sup>。このリアクターは1ヵ月間60℃で連続運転しても分解率の低下もなく、運転中はグリセリンを含む水相の微生物による汚染も観察されなかった。しかしその処理速度は、著しく遅い固定床内の油水分離速度以下で運転しなければならなかった。固定化リパーゼ表面の反応物質の移動速度が遅いので、その表面に反応物質が滞留して外部拡散抵抗を大きくしていると考えられた<sup>33, 34)</sup>。

#### (4-2) 向流式流動床型油脂分解リアクター

外部拡散抵抗を低下させると共に、固定化リパーゼの充填してある反応槽での油水分離速度を速めるために、攪拌槽を設けたリアクターでの反応を行った。攪拌によって生じる乳化基質は、ふるい板と静置槽とで連続相の基質にし内部拡散抵抗を低下させた。Fig. 5 のような *P. fluorescens* biotype I 由来の固定化リパーゼを用いた向流式流動床型リアクターにより連続油脂分解と同時に油状産物と水溶性産物の連続分別採取を行った。このリアクターは Table 5 のように水相の供給速度を油相の供給速度より遅くすれば水相のグリセリンの連続濃縮も可能であった。本リアクターは連続分解、連続分別採取及び連続濃縮処理をインテグレートした実例である<sup>33, 35)</sup>。

#### (4-3) トリアシルグリセロール合成リアクター

弱塩基性陰イオン交換樹脂に (3-3) のように固定化したムコール属のリパーゼは、Fig. 6 のごとく微水系において活性を維持する性質を有していた<sup>36)</sup>。この性質は *M. javanicus* および *M. miehei* 由来の固定化リパーゼに見られたので、以下の実験には、後者の Lipozyme IM60 を用いた。遊離の不飽和脂肪酸を多く含んでいるので食用にならず、南アジアの米作地帯で未利用資源として問題になって

---

<sup>33)</sup> D. I. C. Wang, 農化, 64, 839 (1990).

いる高酸価の米ぬか油から、24時間毎に70-80%の収率で36日間トリアシルグリセロールを生産することに成功した<sup>12)</sup>。リアクターは Fig. 7のような固定化酵素反応と脱水処理をインテグレートしたものである。トリアシルグリセロール合成に必要な化学量論量の基質を、60℃にて *M. miehei*由来の固定化リパーゼ酵素反応と脱水処理を同時に行った。収率を向上させるためには最終的に100ppm以下の水分濃度にする必要があり、水分濃度10ppm以下の超微水系においても 合成反応は進行していた。

エイコサペンタエン酸及びグリセリンを、脱水処理しながら *M. miehei*由来の固定化リパーゼと反応すると、80%以上の収率で トリエイコサペンタエノイルグリセロールが生成した<sup>11)</sup>。アルミナカラムで精製し ガスクロマトグラフィーのキャピラリーカラム(WCOT CP-SIL88)及びHPLCカラム(Shodex GPC KF-802 300x3)で純度99%のトリエイコサペンタエノイルグリセロールが得られた。その<sup>1</sup>H-NMRスペクトルをFig. 8に示す。メインピークの化学シフトの帰属も、ピークの大きさから判定される水素元素数もf, gの大きさを4として計算すると、これも理論値とほぼ一致した。本化合物のような  $\eta$ -3高度不飽和脂肪酸トリアシルグリセロールは、酸化され易く二重結合の異性化や移動が起こり易いが、脱水処理をインテグレートしたリアクターにより高収率で合成できた。なお  $\eta$ -3高度不飽和脂肪酸トリアシルグリセロールは市販されているそのエチルエステルより消化吸収がよく、しかも  $\eta$ -6脂肪酸トリアシルグリセロールと拮抗する作用を有する機能性食品として注目されている。

## 結論

本研究は新規な耐熱性リパーゼの探索発見とともに油脂分解の効率化及び連続化を図ったものである。また、油脂分解の逆反応を利用して不飽和脂肪酸を多く含む油脂の酵素的合成を行なったものである。

60℃の温度で牛脂等の分解曲線を比較して、グリセリドの $\alpha$ および $\beta$ 位にすべてに作用し、60℃において長時間使用できる耐熱性リパーゼを生産する *P. fluorescens* biotype I等を分離した。

乳化基質及び非乳化基質を用いた場合の *P. fluorescens* biotype I由来の固定



化リパーゼの活性収率について解析し、基質の内部拡散抵抗を低下させる条件を導いた。油脂分解曲線の新近似法を確立し、最終分解率 $R$  および反応の立ち上がりを評価する新パラメーター $t_{1/2}$ を導入した。 $t_{1/2}$ は最終分解率 $R$ の1/2になるまでの反応時間である。

細胞に結合したリパーゼの固定化法を開発しその反応解析、およびアフィニティクロマトグラフィーの技術をリパーゼ反応解析法に導入し、疎水基へのリパーゼの吸着溶出条件を解明した。これらの知見を参考にして生産物阻害を受けないような新たな機能を持った、*P. fluorescens* biotype I由来の固定化リパーゼを開発し市販されるに至った。

向流式リアクターの油水分離速度を早め、二相をなす反応物質の拡散抵抗を低下させる条件を解析し、撹拌槽と静置槽とを一体化したリアクターを構築した。本リアクターは連続油脂分解、油状生産物と水溶性生産物の連続分別採取及び水溶性生産物の連続濃縮を同時に行うことを可能とした。

微水系で活性を維持できる*Mucor*属由来の固定化リパーゼを開発し、*M. miehei*由来の固定化リパーゼを用いてエステル合成反応と脱水処理を一体化したリアクターによるトリアシルグリセロール、米ぬか油およびトリエイコサペンタエノイルグリセロールを高収率で生産することに成功した。

## 原著論文

- 1) Y. Kosugi and A. Kamibayashi, J. Ferment. Technol., 49, 968-980 (1971).
- 2) Y. Kosugi, H. Suzuki and T. Funada, Biotechnol. Bioeng., 31, 349-356 (1988).
- 3) Y. Kosugi, H. Tanaka and N. Tomizuka, Biotechnol. Bioeng. 36, 617-622 (1990).
- 4) Y. Kosugi and H. Suzuki, J. Ferment. Technol., 61, 287-294 (1983).
- 5) Y. Kosugi and H. Suzuki, J. Ferment. Technol., 51, 895-903 (1973).
- 6) Y. Kosugi and H. Suzuki, J. Lipid Res., 17, 307-313 (1976).
- 7) Y. Kosugi and H. Suzuki, J. Ferment. Technol., 52, 577-582 (1974).
- 8) Y. Kosugi, H. Suzuki, Biotechnol. Bioeng. 印刷中.
- 9) Y. Kosugi, H. Igusa and N. Tomizuka, J. Jpn. Oil Chem. Soc., 36, 769-776 (1987).
- 10) 小杉佳次, 白木 勝, 国枝 勉, 東 直輝: 日本醸酵工学会大会講演要旨集 1990 p.42; 報文準備中.
- 11) 小杉佳次, Claudia Lopez, 東 直輝: 農化, 65, 438 (1991); 報文準備中.

## 参考論文

- a) 小杉佳次: 第一工業製薬社報 443, 4-11 (1986). Chemical Abstracts 106: 3719j (1987).
- b) 小杉佳次, 鈴木英雄, 上林 明, 船田 正, 赤池祥光, 本多 進: 特公昭 57-59753 (1982).
- c) Y. Kosugi, H. Tanaka and N. Tomizuka: Proceedings of Session Lectures and Scientific Presentations on ISF-JOCS World Congress 1988, The Japan Oil Chemists' Society, 1989, p.1069-1075.
- d) 小杉佳次, 鈴木英雄: 微生物工業技術研究所研究報告, 61, 11-21 (1984).
- e) 小杉佳次: 化学と生物, 14, 580-581 (1976).
- f) 小杉佳次, 富塚 登, 鈴木英雄: 醸酵工学, 65, 439 - 441 (1987).
- g) 小杉佳次: 油脂 42 (12), 238-241 (1989).

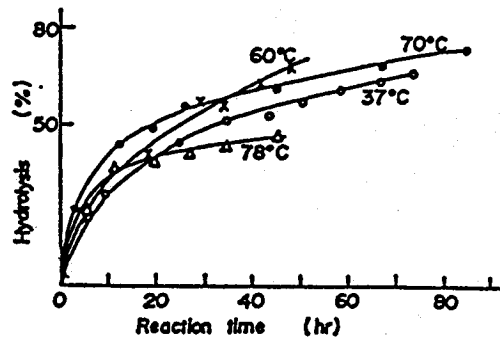


Fig. 1. Effect of temperature on the hydrolysis of oil using lipase from *P. mephitica* var. *lipolytica*.<sup>1)</sup> The reaction mixture, composed of 1 g of olive oil, 1 ml of 1 M calcium chloride solution, 1 ml of acetone-fractionated lipase solution (140 units), and 7 ml of water, was incubated at various temperatures in the L-type flask.

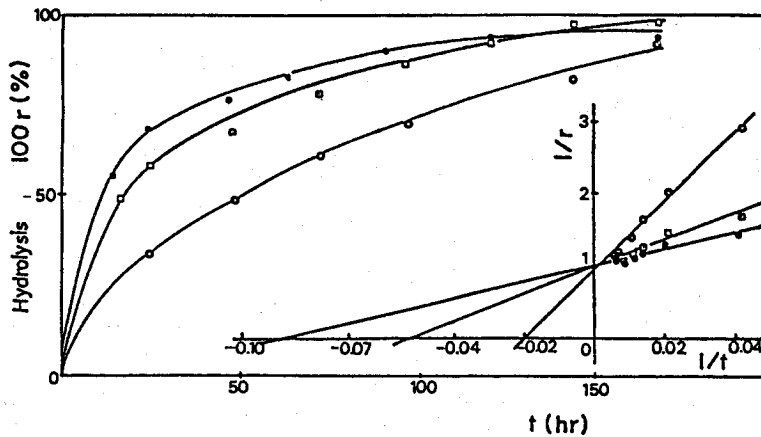


Fig. 2. Progress curves and the double reciprocal plots of the lipase reaction.<sup>2)</sup> Lipolysis was carried out at 40 °C in a reaction mixture composed of 1 g beef tallow and 1 ml lipase. The amount of lipase was 100 units measured at 40°C. The origins of the lipase were (O) *P. fluorescens* biotype I, (●) *P. cepacia*, and (□) *C. cylindracea*.

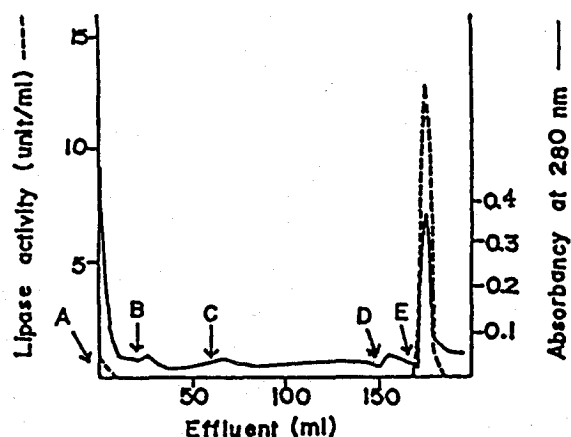
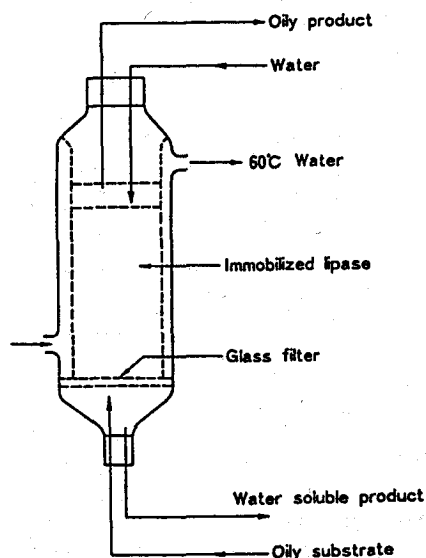


Fig. 3. Elution pattern of lipase from *P. mephitica* var. *lipolytica*.<sup>7)</sup> Dodecylamine-Sepharose 4B (2 ml) was packed in a column and 0.5 ml of lipase (73.6 units) was applied. The specific activity was 84.6. Elution was attempted by varying the conditions as indicated by the arrows. A and D designate the start of elution with Tris-HCl buffer at pH 8; B, that with 0.1 M acetate buffer at pH 5 containing 1.5 M NaCl; C, that with  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH buffer at pH 11 containing 1.5 M KCl; E, that with Tris-HCl buffer at pH 8 containing 0.5 % (w/v) of sodium deoxycholate. Total activity eluted with the last elution was 65.7 units and the specific activity was 227.3. The dotted line represents activity and the solid line, protein.

Fig. 4. Fixed bed reactor.<sup>3)</sup> The column was 195 mm in length and 41 mm in diameter. The olive oil was fed at a flow rate 0.6 ml/hr upwardly, the water was fed at a flow rate of 0.4 ml/hr. Consequently, an oily product eluted at a flow rate of 0.61 ml/hr.



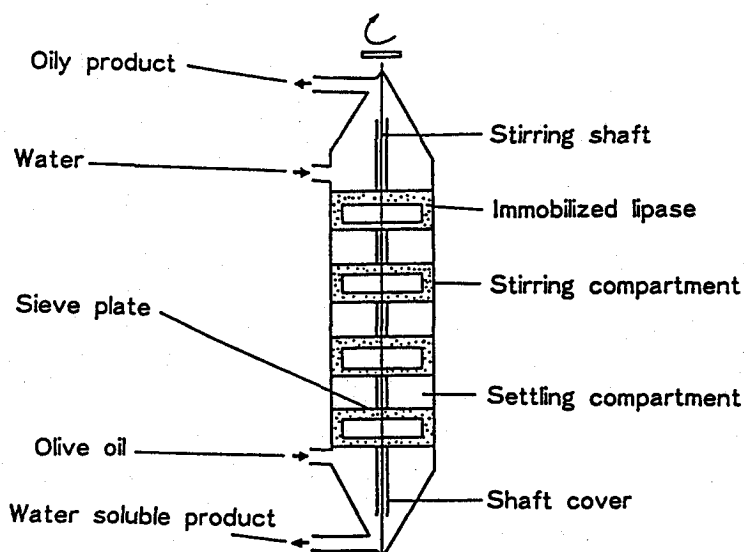


Fig. 5. Fluidized bed reactor.<sup>3)</sup> Each compartment was 100 mm in diameter and 30-31 mm in height. Total volume of the reactor was 2.76 l and that of stirring compartments was 0.97 l. The four stirring compartments were each charged with 35 g (dry weight) of lipase from *P. fluorescens* biotype I immobilized to Dowex MWA-1. The agitation speed was 7.8 rpm. Olive oil and water were supplied by a pump and water soluble product was collected by a pump. The oily product was eluted continuously.

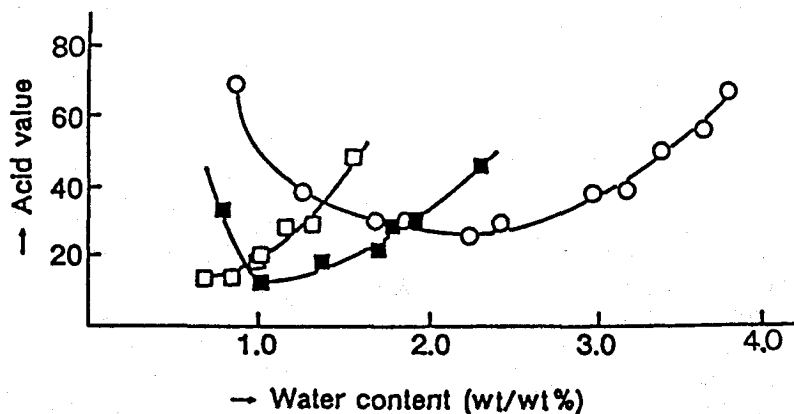


Fig. 6. Effect of lipase origin and water content on esterification.<sup>9)</sup> Reaction mixture was composed of 1 g high free fatty acid rice bran oil, 0.5 g of lipase from *mephitica* var. *lipolytica* (O), or *R. niveus* (■), or *M. javanicus* (□) immobilized to Dowex MWA-1 and various amounts of glycerol. Reaction time was 120 hr and reaction temperature was 60 °C for the lipase from *P. mephitica* var. *lipolytica* and 40 °C for the ones from *R. niveus* and *M. javanicus*.

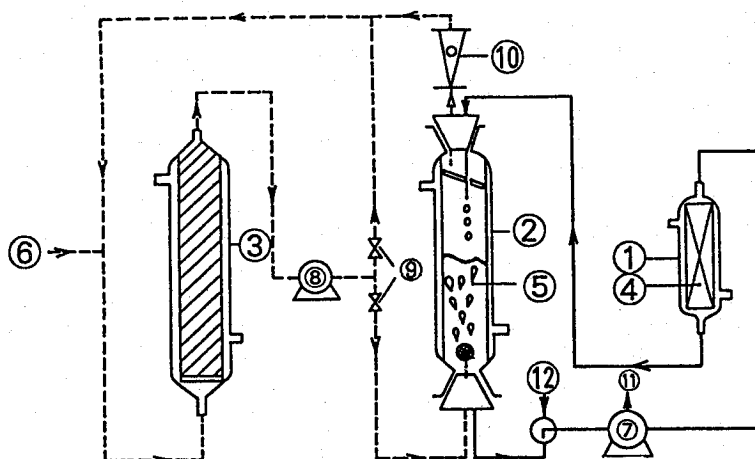


Fig. 7. Schematic diagram of esterification reactor system.<sup>10)</sup>

1, Fixed bed reactor at 60°C; 2, dehydrator using dry nitrogen; 3, molecular sieve column; 4, immobilized lipase (1.25 g of Lipozyme IM 60); 5, substrate (25 g of high free fatty acid rice bran oil and 0.9 g of glycerol); 6, nitrogen cylinder; 7, liquid pump; 8, air pump; 9, needle valve; 10, flow meter; 11, outlet for product; 12, inlet for substrate. The solid line represents the path of substrate and the dotted line, that of nitrogen gas.

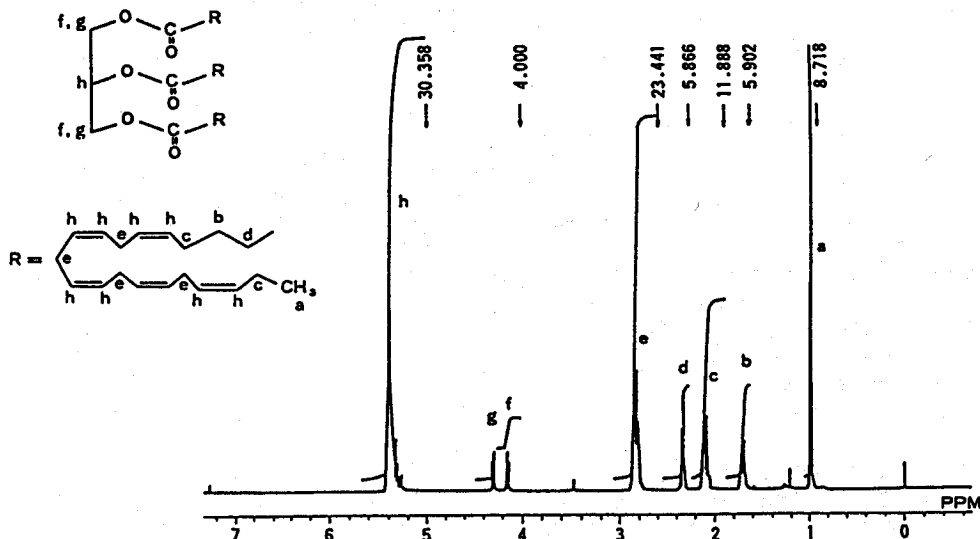


Fig. 8. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of triecosapentaenoylglycerol.<sup>11)</sup> The chemical shifts of main peaks (a-h) were corresponded to the chemical bonds (a-h) of triecosapentaenoylglycerol. Relative values of integrated ones were expressed. The value of peaks g and f was 4.000 because the proton number of these bonds was 4.

Table 1. Analysis of hydrolysates during the lipolysis.<sup>2)</sup> Lipolysis was carried out at 60°C with a reaction mixture composed of 1 g beef tallow and 1 ml lipase from P. fluorescens biotype I.

Sample	1	2	3	4
Reaction ratio (%)	49.1	65.0	89.9	96.9
Glyceride composition [% (w/w)]				
Triglyceride	20.6	16.6	7.0	6.5
1,3-Diglyceride	7.9	5.7	5.4	2.0
1,2-Diglyceride	17.9	9.3	1.0	0.0
Fatty acid	46.7	61.8	85.4	91.3
2-Monoglyceride	2.5	3.7	0.0	0.0
1-Monoglyceride	4.3	3.5	1.3	0.0

Table 2. Activity of lipase preparation on different substrates.<sup>3)</sup> The lipase from P. fluorescens biotype I was used and it was immobilized on Dowex MWA-1. The activity yield was obtained from the ratio of immobilized lipase activity to the activity of the lipase used for preparation of the immobilized lipase.

Substrate	Product	Activity of soluble lipase (units)	Activity of immobilized lipase (units)	Activity yield (%)
Olive oil (12.5%) emulsion in polyvinyl alcohol solution	Fatty acid	1185	1.33	0.11
Tributylin (3%) emulsion in polyvinyl alcohol solution	Fatty acid	1450	6.86	0.47
Olive oil (0.6%) emulsion in Tween 60 solution	Fatty acid	248	2.07	0.83
	Glycerol	32.9	0.28	0.85
Triacetin (2.2%) solution in 0.1M phosphate buffer at pH 7	Fatty acid	3.47	1.33	44.2

Table 3. Lipolytic activity of various preparations.<sup>5)</sup> The cell from P. mephitica var. lipolytica was used. The activity was measured with olive oil emulsion. \*The juice of disintegrated cells was centrifuged at 13,500 x g for 10 min, and 97 % of the activity was observed in the supernatant fluid and 3 % in the suspension of the precipitate.

	Activity/g cell	Extraction %
Suspension of the fixed lipase	1005	
Suspension of the living cell	1068	
Solution extracted from the cell incubated at pH 7.4°C for 16 hr and disintegrated by cell homogenizer and sonic disintegrator	1200	97*
Solution extracted from the cell incubated at pH 7.4°C for 16 hr and disintegrated by cell homogenizer	1118	89
Solution extracted from the cell incubated at pH 7.4°C for 16 hr	0	0
Solution extracted from the cell incubated at pH 7.45°C for 16 hr.	1207	93

Table 4. Comparison of final hydrolysis ratio using soluble lipase or immobilized lipase.<sup>8,9)</sup> Lipase from P. fluorescens biotype I (1450 units) was immobilized on Dowex MWA-1. Final hydrolysis ratios were measured at 60°C in the reaction mixture composed of beef tallow, 0.1 M phosphate buffer at pH 7 and the immobilized lipase or the soluble lipase (1450 units).

	Substrate concentration (%)					
Lipase preparation	40.0	50.0	66.7	80.0	90.0	94.0
Immobilized lipase	99.9%	94.2%	95.4%	92.8%	90.0%	73.2%
Soluble lipase	100.0	99.7	94.7	84.7	57.2	40.2



Table 5. Continuous hydrolysis of olive oil in fluidized bed reactor.<sup>3)</sup> After the reaction time of 545.5 hr. the oil feed rate was kept at 5.0 ml/hr. After the reaction time of 762 hr, the oil feed rate was kept 2.5 ml/hr until 1201 hr. After the reaction time of 1555 hr, the oil feed rate was kept again at 5.0 ml/hr. The water feed rate was maintained at half of the oil feed rate and the reaction temperature was 60°C.

Reaction time, hr	545.5	698.2	762.0	1032.2	1141.1	1201.0
Hydrolysis ratio, %	77.5	79.1	79.4	83.5	83.0	82.7
Glycerol, mg/ml	108.7		110.5		124.3	147.3

1555.0 1842.3

84.9 71.7

## 審査結果の要旨

リパーゼは油脂の分解，エステル合成，エステル交換反応を触媒する一群の酵素である。工業的な油脂分解のためには，60～70℃で作用する耐熱性リパーゼがあると牛脂などの融点の高い油脂の分解に応用可能となる。本研究者は，耐熱性リパーゼ生産菌を探索した結果，Pseudomonas mephitica var. lipolytica 菌と Pseudomonas fluorescens biotype I 菌ならびに高温反応性でしかも油脂分解性の優れたリパーゼの生産菌 Pseudomonas cepacia を得た。

リパーゼの反応は油と水の二相の界面における反応である。活性測定には乳化基質を使う方法と，振とうによる非乳化基質を使う方法とがある。本研究者はリパーゼ反応の経過を解析するための新しい近似法を確立した。この式により，リパーゼ反応の最終分解率を  $R$  とすると分解率が  $R/2$  になるまでの時間  $t_m$  を容易に求めることが可能となった。

連続油脂分解を行うために固定化リパーゼを応用した。P. mephitica var. lipolytica リパーゼは細菌表層に結合していることを明かにし，この菌体固定化リパーゼを連続分解に供した。この菌体固定化標品は長鎖のトリグリセリドの連続分解は困難であった。次いで，アガロースに各種の疎水性基を結合させ，リパーゼの吸着，溶出を行う親和クロマトグラフィーに初めて成功した。さらに，P. fluorescens biotype I のリパーゼを弱塩基性陰イオン交換樹脂 Dowex MWA-1 に吸着させ，グルタルアルデヒドで強化する方法により高濃度の牛脂分解を可能とした。

不均一系のバイオプロセスの連続化のため P. fluorescens biotype I リパーゼによる向流式固定床型油脂分解リアクター，ならびに向流式流動床型油脂分解リアクターを開発した。後者は連続分解，連続分別採取および連続濃縮処理を備えたリアクターである。Mucor javanicus および M. miehei のリパーゼの合成反応を利用し，固定化酵素と脱水処理を備えたリアクターを構築し，東南アジアで未利用資源となっている高酸化の米ぬか油からトリアシルグリセロールを合成した。次いで，エイコサペンタエン酸とグリセロールから80%以上の収率でトリエイコサペンタエノイルグリセロールを合成した。このものは消化吸収が良く機能性食品としても注目されている。

以上の結果，審査員一同本研究者に博士（農学）の学位を授与するに価するものと認定した。